

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-249856

(43)Date of publication of application : 09.09.1994

(51)Int.Cl.

G01N 35/00

G01N 21/27

G01N 21/75

(21)Application number : 05-062850

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 26.02.1993

(72)Inventor : NAKANO KIYOKAZU

(54) MEASUREMENT OF AUTOMATIC BIOCHEMICAL ANALYZING DEVICE

(57)Abstract:

PURPOSE: To permit the speedy inspection by reducing the number of times of reinspection, eliminate the uselessness of samples and reagents, and prevent the deterioration of the actual processing faculty of an automatic analyzing device.

CONSTITUTION: The limit absorbancy within the absorbancy range for obtaining the concentration of the inspected component of a sample with high reproducibility from the absorbancy variation (rate) is determined, and the absorbancy variation rate of the inspected liquid in a reaction process is measured at plural times by using a plurality of standard samples having different concentration, and the concentration conversion coefficient for converting absorbancy variation (rate) to concentration at each time of a plurality of reaction times which are previously determined for the absorbancy of each standard sample which satisfies the limit absorbancy. The absorbancy variation (rate) of an unknown sample is measured at plural times in a reaction process, and the absorbancy at each reaction time ranging from the longer reaction time to the shorter reaction time among the previously determined plural times is compared with the limit absorbancy, and the reaction time satisfying the limit absorbancy and the absorbancy variation (rate) at that time are adopted, and the concentration of the inspected component is obtained by using the concentration conversion coefficient and the reagent blank value at the adopted reaction time.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-249856

(43)公開日 平成6年(1994)9月9日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 35/00	A	7370-2 J		
21/27	F	7370-2 J		
21/75	Z	7906-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数2 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平5-62850

(22)出願日 平成5年(1993)2月26日

(71)出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72)発明者 中野 清和

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

株式会社島津製作所三条工場内

(74)代理人 弁理士 野口 繁雄

(54)【発明の名称】 生化学自動分析装置における測定方法

(57)【要約】

【目的】 再検査を減らして検査を迅速化し、試料や試薬の無駄を省き、自動分析装置の実処理能力の低下を防止する。

【構成】 吸光度変化(率)から試料の被検成分の濃度を再現性よく求めることのできる吸光度範囲の限界吸光度を定めておき、濃度の異なる複数種の標準試料を用いて反応過程にある被検液の吸光度変化率を複数の時刻で測定し、各標準試料の吸光度で限界吸光度を満足するものについて予め定めた複数の反応時間の時刻ごとに吸光度変化(率)を濃度に変換する濃度変換係数を求め、未知試料の被検液の吸光度変化(率)を反応過程の複数の時刻で測定し、予め定めた複数の反応時刻について反応時間の長いものから短いものへとそれぞれの反応時刻における吸光度を限界吸光度とを比較し、限界吸光度を満足する反応時刻とそのときの吸光度変化(率)を採用し、その採用した反応時刻における濃度変換係数及び試薬ブランク値を用いて被検成分濃度を求める。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生化学自動分析装置を用い、試料と試薬を反応させた被検液の吸光度から試料の被検成分の濃度を求めるエンドポイント法による測定方法において、吸光度から試料の被検成分の濃度を再現性よく求めることのできる吸光度範囲の限界吸光度を定めておくこと、濃度の異なる複数種の標準試料を用いて反応過程にある被検液の吸光度を複数の時刻で測定し、各標準試料の吸光度で前記限界吸光度を満足するものについて予め定めた複数の反応時間の時刻ごとに吸光度を濃度に変換する第 1 の濃度変換係数を求めること、未知試料の被検液の吸光度を反応過程の複数の時刻で測定し、予め定めた前記複数の反応時刻について反応時間の長いものから短いものへとそれぞれの反応時刻における吸光度を前記限界吸光度とを比較して前記限界吸光度を満足する反応時刻とそのときの吸光度を採用すること、及びその採用した反応時刻における第 1 の濃度変換係数及び試薬ブランク値を用いて被検成分濃度を求めること、を含む測定方法。

【請求項 2】 生化学自動分析装置を用い、試料と試薬を反応させた被検液の吸光度変化率から試料の被検成分の濃度を求めるレート法による測定方法において、吸光度変化率から試料の被検成分の濃度を再現性よく求めることのできる吸光度範囲の限界吸光度を定めておくこと、濃度の異なる複数種の標準試料を用いて反応過程にある被検液の吸光度変化率を複数の時刻で測定し、各標準試料の吸光度で前記限界吸光度を満足するものについて予め定めた複数の反応時間の時刻ごとに吸光度変化率を濃度に変換する第 2 の濃度変換係数を求めること、未知試料の被検液の吸光度変化率を反応過程の複数の時刻で測定し、予め定めた前記複数の反応時刻について反応時間の長いものから短いものへとそれぞれの反応時刻における吸光度を前記限界吸光度とを比較して前記限界吸光度を満足する反応時刻とそのときの吸光度変化率を採用すること、及びその採用した反応時刻における第 2 の濃度変換係数及び試薬ブランク値を用いて被検成分濃度を求めること、を含む測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は血清、血漿、尿などの生体液試料を分析する生化学自動分析装置において、吸光度測定値から試料の被検成分濃度を求める方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 一般に試料中の被検成分が高濃度になると、反応の進行とともに吸光度の反応タイムコースは直線的な吸光度変化を示さず、検量線は非直線的な関係となる。そこで、被検成分が高濃度な試料では、次のような方法で対処している。

(1) 試料が高濃度であることを予測して、広い濃度範囲をカバーできるような分析条件、例えば試料量 (S) / 試薬量 (R) 比を小さくしておく。

【0003】 (2) 一度測定した後、その試料が高濃度であることが分かれば試料を希釈して再検査する。

(3) 再検査の際、初回よりも少ない試料量で再検査する。

(4) レート法 (カインティック・アッセイ) の場合、反応タイムコースが直線的な吸光度変化を示す吸光度範囲 (限界吸光度 AL) を定めておき、AL を満足する吸光度測定値から単位時間当りの吸光度変化率 (Abs / 分) を求め、定量している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上記の (1) の方法では測定可能な濃度範囲は基本的に S / R 比で決まるため、高濃度な試料まで測定できるようにすることを優先させることによって低濃度域での再現性不良を招いていた。

【0005】 (2) と (3) の方法は、再検査を行なうため迅速性に欠ける。試料及び分析試薬を余分に必要とする。さらに、生化学自動分析装置の実処理能力の低下を招いていた。(4) の方法は、反応タイムコースが直線的な吸光度変化を示す酵素活性測定にしか適用することができず、臨床的に重要な項目であるグルコース、クレアチニン、尿素窒素などの測定には適用することができない。

【0006】 本発明は再検査を減らして検査を迅速化し、試料や試薬の無駄を省き、自動分析装置の処理能力を上げることが目的とするものである。本発明はまた測定濃度範囲を広げることも目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 エンドポイント法による被検液の吸光度、又はレート法における被検液の吸光度変化率から被検成分濃度を求めるための濃度変換係数は、従来は 1 種類しか用意されていないのに対し、本発明では予め設定された複数の測定時刻ごとに濃度変換係数を用意しておく。そして未知試料の測定では、反応過程にある被検液を複数の時刻で測定し、得られた吸光度測定値を限界吸光度と比較し、限界吸光度を満たす吸光度測定値のうちで最も反応時間の長い測定時刻での吸光度又は吸光度変化率を採用し、その測定時刻に対応する濃度変換係数及び試薬ブランク値を適用して被検成分濃度を求める。

【0008】 本発明をエンドポイント法に適用するときは、次のステップ (A) から (D) を含んでいる。

(A) 吸光度から試料の被検成分の濃度を再現性よく求めることのできる吸光度範囲の限界吸光度を定めておくこと、(B) 濃度の異なる複数種の標準試料を用いて反応過程にある被検液の吸光度を複数の時刻で測定し、各標準試料の吸光度で前記限界吸光度を満足するものにつ

いて予め定めた複数の反応時間の時刻ごとに吸光度を濃度に変換する第1の濃度変換係数を求めること、(C)未知試料の被検液の吸光度を反応過程の複数の時刻で測定し、予め定めた前記複数の反応時刻について反応時間の長いものから短いものへとそれぞれの反応時刻における吸光度を前記限界吸光度とを比較して前記限界吸光度を満足する反応時刻とそのときの吸光度を採用すること、及び(D)その採用した反応時刻における第1の濃度変換係数及び試薬ブランク値を用いて被検成分濃度を求めること。

【0009】本発明をレート法に適用するときは、次のステップ(a)から(d)を含んでいる。(a)吸光度変化率から試料の被検成分の濃度を再現性よく求めることのできる吸光度範囲の限界吸光度を定めておくこと、

(b)濃度の異なる複数種の標準試料を用いて反応過程にある被検液の吸光度変化率を複数の時刻で測定し、各標準試料の吸光度で前記限界吸光度を満足するものについて予め定めた複数の反応時間の時刻ごとに吸光度変化率を濃度に変換する第2の濃度変換係数を求めること、

(c)未知試料の被検液の吸光度変化率を反応過程の複数の時刻で測定し、予め定めた前記複数の反応時刻について反応時間の長いものから短いものへとそれぞれの反応時刻における吸光度を前記限界吸光度とを比較して前記限界吸光度を満足する反応時刻とそのときの吸光度変化率を採用すること、及び(d)その採用した反応時刻における第2の濃度変換係数及び試薬ブランク値を用いて被検成分濃度を求めること。

【0010】

【作用】図1を参照し、試料と試薬を反応させることによって吸光度が上昇する反応の場合について、レート法を例にして説明する。濃度の異なる複数種の標準試料を用い、あらかじめ設定した複数の測定時刻(測定区間I, II, III)ごとの濃度変換係数 K_1 , K_2 , K_3 と試薬ブランク値変化 $\Delta A b_1$, $\Delta A b_2$, $\Delta A b_3$ を求めておく(ステップS1)。測定区間Iは反応開始直後の時刻 t_1 から t_m までの区間、測定区間IIは反応開始直後の時刻 t_1 から t_n までの区間、測定区間IIIは反応開始直後の時刻 t_1 から最終測定時刻 t_e までの区間($t_m < t_n < t_e$)である。

【0011】未知試料の測定において、 $t_1 \sim t_e$ 間の異なる複数の時刻で吸光度を測定して測定データとして取り込み記憶させる(ステップS2)。記憶されたデータについて、最終の吸光度 A_e を限界吸光度 A_L と比較し、 $A_e < A_L$ であれば、反応時間 t_1 から t_e までの最も長い反応時間の区間IIIでの吸光度変化率($\Delta A / \Delta t$) $_3$ を最小二乗法により計算する(ステップS4)。その吸光度変化率と区間 $t_1 \sim t_e$ における試薬ブランク値変化 $\Delta A b_3$ とから濃度変換係数 K_3 を用いて濃度が算出され、出力される(ステップS5)。

【0012】最終吸光度 A_e が A_L 以上であるときは、それより反応時間の短い予め定められた反応時刻 t_n における吸光度 A_n が限界吸光度 A_L と比較され(ステップS3, S6)、 $A_n < A_L$ であればその $t_1 \sim t_n$ の区間IIにおける吸光度変化率($\Delta A / \Delta t$) $_2$ が算出される(ステップS7)。得られた吸光度変化率($\Delta A / \Delta t$) $_2$ と、 $t_1 \sim t_n$ の区間IIにおける濃度変換係数 K_2 及び試薬ブランク値変化 $\Delta A b_2$ を用いて濃度が算出され、出力される(ステップS5)。

【0013】さらに、 A_n が A_L 以上であれば、それよりも反応時間の短い予め定められた反応時刻 t_m における吸光度 A_m が限界吸光度 A_L と比較され(ステップS6, S8)、 $A_m < A_L$ であればその $t_1 \sim t_m$ の区間Iにおける吸光度変化率($\Delta A / \Delta t$) $_1$ が算出される(ステップS9)。得られた吸光度変化率($\Delta A / \Delta t$) $_1$ と、 $t_1 \sim t_m$ の区間Iにおける濃度変換係数 K_1 及び試薬ブランク値変化 $\Delta A b_1$ を用いて濃度が算出され、出力される(ステップS5)。

【0014】図1では試料と試薬を反応させることによって吸光度が上昇する反応の場合について説明しているが、反応が進むにつれて吸光度が下降する場合もある。吸光度下降反応では、図1のステップS3, S6, S8における不等号は逆方向となる。また、ステップS3, S6, S8では共通の限界吸光度 A_L を用いているが、それぞれの測定時刻 t_m , t_n , t_e で異なる限界吸光度を設定しておいてもよい。

【0015】また、吸光度変化率は t_1 から始まる測定区間での勾配として計算しているが、特定の時間 $t_i \sim t_j$ について勾配を求め、それぞれの区間ごとに濃度変換係数と試薬ブランク値変化を求めておいてもよい。図1はレート法の説明であるが、これをエンドポイント法に適用するときは、吸光度変化率($\Delta A / \Delta t$)に代えて特定の時刻での吸光度 A_e , A_n 又は A_m を用い、試薬ブランク値変化 $\Delta A b$ を試薬ブランク値 $A b$ に置き換えればよい。

【0016】2種類の分析試薬を使用して第2試薬添加前に試料ブランク値を測定する場合は、次の式により試料ブランク値($A s b$)を算出して限界吸光度 A_L を修正するようにしてもよい。

$$A s b = (A s_1 - A b_1) (V s + V r_1) / (V s + V r_1 + V r_2)$$

$$A L' = A L + A s b$$

ここで、 $A s_1$ と $A b_1$ はそれぞれ第2試薬添加前の(試料+第1試薬)液及び試薬ブランク液の吸光度、 $V s$, $V r_1$, $V r_2$ はそれぞれ試料、第1試薬、第2試薬の液量である。

【0017】

【実施例】一例としてクレアチニンを測定した例を説明する。クレアチニンの反応は次の式で表わされる。

クレアチニン+ピクリン酸 \longrightarrow アルカリ性ピクレート
アルカリ性, 37℃

【0018】第1試薬としてアルカリ液を試料に添加し、人体の体温と同じ37℃に設定する。それに第2試薬としてピクリン酸を添加すると、試料中のクレアチニンは試薬中のピクリン酸と反応して500nm付近で吸収を示すアルカリ性ピクレートを生成する。試料量を3 μ l、第1試薬及び第2試薬の量をそれぞれ200 μ lとし、510nmでアルカリ性ピクレートの吸光度を測定すると、図2に示される反応タイムコースが得られた。複数の曲線は上方向に描かれているものほど高濃度試料であることを示している。図2において縦軸のスケールは吸光度2000mAbsとなっており、最も高濃度試料は測光ポイント30付近からスケールアウトしている。実際には、2000mAbs以上まで反応は進行している。

【0019】限界吸光度ALを3.0Absで一定とし、その限界吸光度よりも小さい範囲で吸光度変化率を求めると、 t_1 を測定開始後12秒、 t_m を48秒、 t_n を132秒、 t_e を252秒として3つの反応区間I、II、IIIについて図3に示されるようなクレアチニン濃度に対する結果が得られる。例えば、反応区間IIIの場合、200mg/dl以下しか直線性を示さない。この3つの区間についてそれぞれ吸光度変化率をクレアチニン濃度に換算する濃度換算係数 K_1 、 K_2 、 K_3 が算出される。

【0020】図2の測定結果に対し、従来のように1つのレート測定区間(12~252秒間)内の限界吸光度ALを満足する測定値から単位時間当りの吸光度変化率を求めると、図4に示されるように、限界吸光度ALを1.0、1.5、2.0Absのいずれに設定した場合でも150mg/dl以上の濃度域では原点から伸長した直線の上に乖離する関係となっている。

【0021】一方、本発明で限界吸光度ALとして1.5Abs(共通)を設定し、吸光度変化率を測定すると、3つの測定区間I、II、IIIに対して図5に示されるようにそれぞれ直線上に配列された測定値が得られる。各測定区間I、II、IIIの濃度変換係数 K_1 、 K_2 、 K_3 が図3のデータが予め求められるので、これらの区間の各直線上に濃度変換係数 K_1 、 K_2 、 K_3 をかける

と、図6に示されるように全て一直線上に配列される。この直線関係は500mg/dlまで保持される。

【0022】図2から図6のデータは標準試料について測定したものであるが、未知試料について図1のフローチャートに従って吸光度変化率を測定すれば、図5又は図6の関係からクレアチニン濃度が求められる。なお図2から図6はレート法に適用したものであるが、エンドポイント法でも同様に直線関係が得られる。

【0023】

【発明の効果】本発明では予め設定された複数の測定時刻ごとに濃度変換係数を用意しておき、未知試料の測定では、反応過程にある被検液を複数の時刻で測定し、得られた吸光度測定値を限界吸光度と比較し、限界吸光度を満たす吸光度測定値のうち最も反応時間の長い測定時刻での吸光度又は吸光度変化率を採用し、それにその測定時刻での濃度変換係数を適用して被検成分濃度を求めるようにしたので、再検査が減り、検査が迅速化されるとともに、試料や試薬の無駄を省き、自動分析装置の実処理能力の低下を防止することができる。本発明はまた測定濃度範囲を広げることできる。本発明では、目的及び測定濃度範囲に対して厳密に考える必要がなくなり、試料量を増加させることができ、分析精度を向上させることが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明をレート法に適用した場合を示すフローチャート図である。

【図2】クレアチニンの反応タイムコースを示す図である。

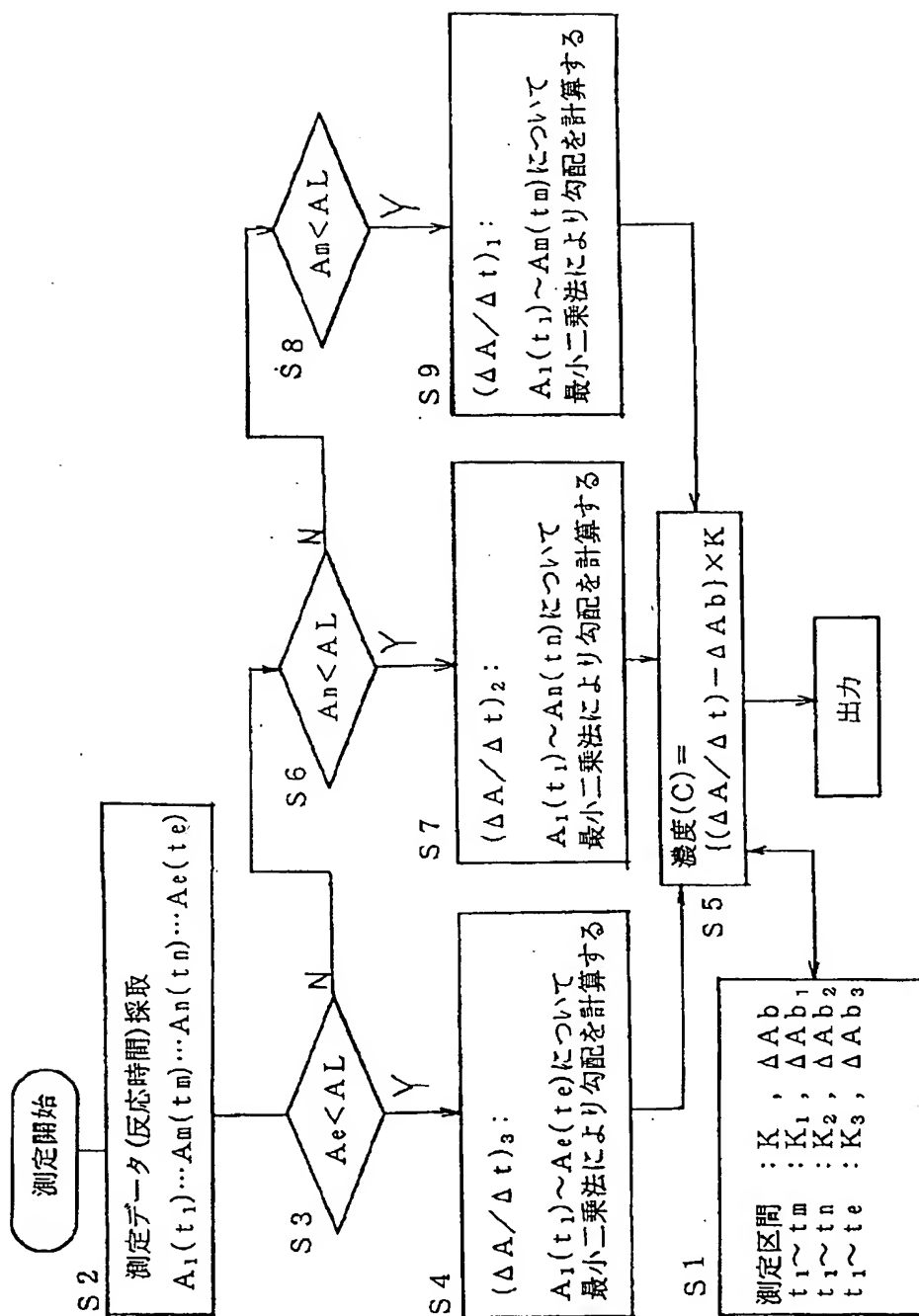
【図3】図2のデータから予め設定された3つの測定区間におけるクレアチニン濃度と吸光度変化率との関係を示す図である。

【図4】図2の測定データを従来の方法により処理した結果を示す図である。

【図5】図2のデータから本発明により採用された吸光度を処理した図である。

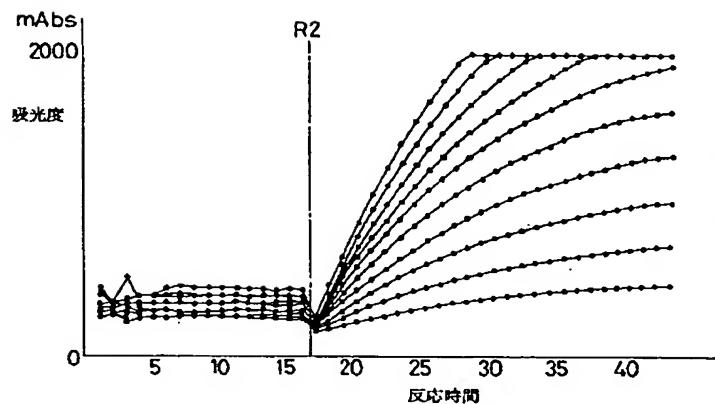
【図6】図5の吸光度に濃度変換係数をかけた結果を示す図である。

【図1】



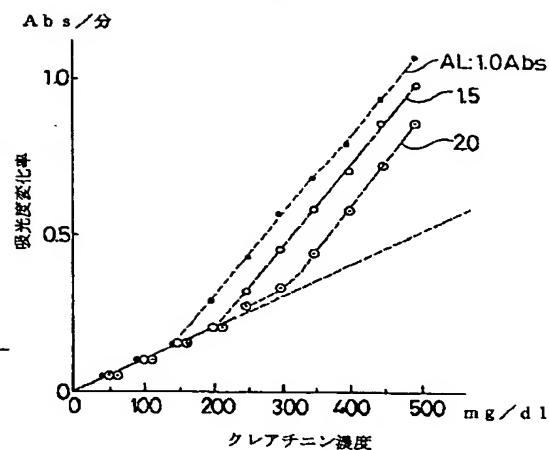
【図2】

クレアチニンの反応タイムコース



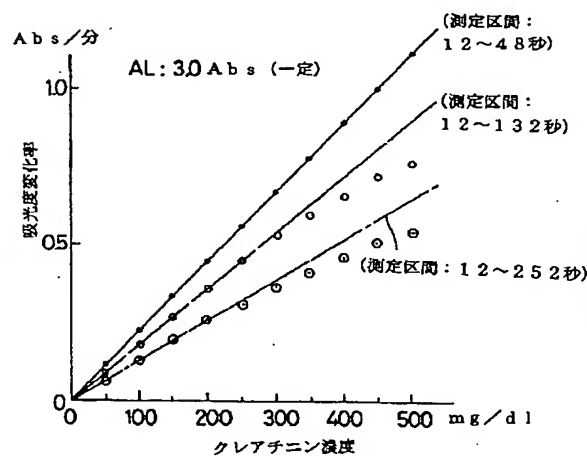
【図4】

従来法による直線性データ



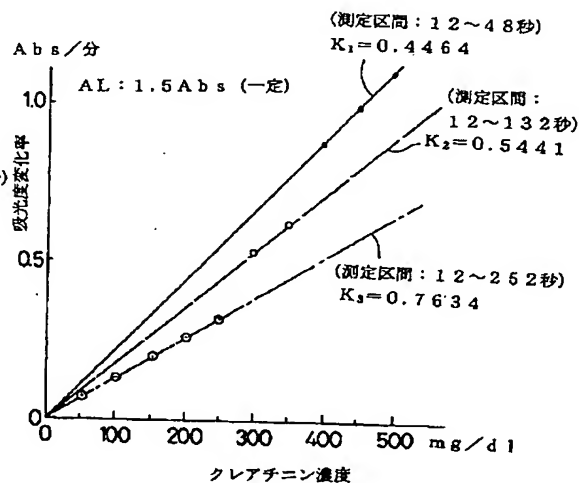
【図3】

本発明による直線性データ



【図5】

本発明による直線性データ



【図6】

